



**TUGAS AKHIR - SB141510**

**OPTIMASI KONDISI LINGKUNGAN MEDIA  
PRODUKSI LIPASE OLEH CANDIDA W 3.8 DARI  
KAWASAN MANGROVE WONOREJO  
SURABAYA**

**RURIN LUSWIDYA ARTATY UMAR  
1512 100 037**

**Dosen Pembimbing  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si**

**Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2016**



**FINAL PROJECT - SB141510**

**ENVIROMENTAL CONDITION OPTIMIZATION  
OF LIPASE PRODUCTION MEDIA BY CANDIDA  
W 3.8 FROM WONOREJO MANGROVE,  
SURABAYA**

**RURIN LUSWIDYA ARTATY UMAR  
1512 100 037**

**Supervisor Lecturer  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si**

**Biology Departement  
Faculty of Mathematic and Natural Science  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2016**

## LEMBAR PENGESAHAN

### OPTIMASI KONDISI LINGKUNGAN MEDIA PRODUKSI LIPASE OLEH *CANDIDA* W 3.8 DARI KAWASAN MANGROVE WONOREJO, SURABAYA

#### TUGAS AKHIR

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
Pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

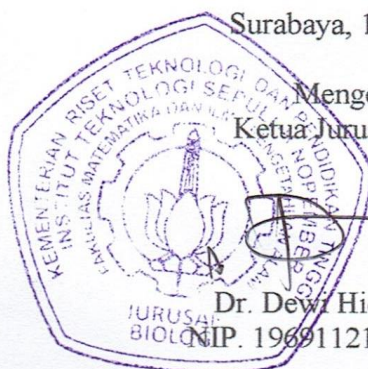
**RURIN LUSWIDYA ARTATY UMAR**  
**NRP. 1512 100 037**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir: .

Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si. .... (Pembimbing)

Surabaya, 18 Juli 2016

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Dewi Hidayati, M.Si.  
NIP. 19691121 199802 2 001

OPTIMASI KONDISI LINGKUNGAN MEDIA PRODUKSI  
LIPASE OLEH *CANDIDA W 3.8* DARI KAWASAN  
MANGROVE WONOREJO, SURABAYA

**Nama Mahasiswa : Rurin Luswidya Artaty Umar**

**NRP : 1512 100 037**

**Jurusan : Biologi**

**Dosen Pembimbing : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si**

**Abstrak**

*Lipase (EC 3.1.1.3) adalah enzim kelas hidrolase, yang bekerja dalam hidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol. Lipase dapat diproduksi dari mikroorganisme. Salah satu kelompok mikroorganisme yang mampu memproduksi lipase adalah marine yeast.*

*Produksi lipase dari marine yeast dapat dilihat dengan uji aktivitas lipase. Produksi lipase dari marine yeast dipengaruhi oleh beberapa faktor kondisi lingkungan, antara lain masa inkubasi, suhu, dan pH. Penelitian ini bertujuan mencari variasi kondisi lingkungan optimal untuk produksi lipase dari Candida W 3.8*

*Penelitian ini menggunakan Candida W 3.8 yang telah diremajakan, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Isolat diinokulasi ke dalam media Yeast Malt Broth (YMB) untuk pembuatan kurva pertumbuhan. Kultur dimasukkan ke dalam media produksi dengan variasi kondisi lingkungan yang terdiri dari masa inkubasi serta pH dan suhu. Selanjutnya diuji aktivitas lipase dengan menggunakan p-Nitrophenyl Palmitate (pNPP). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar p-Nitrophenol (pNP), selanjutnya dimasukkan ke dalam rumus aktivitas lipase. Nilai yang diperoleh dinyatakan dalam satuan aktivitas enzim yaitu U/ml. Desain penelitian menggunakan kombinasi dua faktor. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kuantitatif*

*Hasil penelitian didapatkan kondisi lingkungan optimal untuk produksi lipase oleh Candida W 3.8 adalah pada masa inkubasi 120 jam, serta rentang suhu 27°C - 45°C dan pH 7*

Kata Kunci: *Aktivitas enzim, Candida W 3.8, lipase, marine yeast*

ENVIROMENTAL CONDITION OPTIMIZATION OF  
LIPASE PRODUCTION MEDIA BY *CANDIDA W 3.8*

FROM WONOREJO MANGROVE , SURABAYA

**Student Name** : Rurin Luswidya Artaty Umar  
**NRP** : 1512 100 037  
**Department** : Biology  
**Supervisor** : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si

Abstract

*Lipase (EC 3.1.1.3) is a hidrolase class enzyme, which works in triglyceride hydrolisis into fatty acid and glycerol. Lipase can be produced from microorganism, one of which is marine yeast.*

*Lipase production from marine yeast can be seen in lipase activity test. It is affected by several environmental factors, such as pH, temperature, and incubation time. This research intends to look for the optimization variation on those environmental factors combination to produce lipase from Candida W 3.8*

*This research is conducted using rejuvenated Candida W 3.8 which was incubated for 48 hours in room temperature. Then the isolate were inoculated in media Yeast Malt Broth (YMB) in order to create growth curve. The culture then were being put into media production with various change in incubation time, pH, and temperature. Lipase activity were tested by using p-Nitrophenyl Palmitate (pNPP). Absorbency was measured by spektrofotometer on wavelength 410 nm. Absorbency result were put into equation of standard curve p-Nitrophenol (pNP), and then being used as an input on lipase activity formula. The result are stated in enzym activity unit, which is U/ml. Research design is being done by the combination of two factors, and the obtained data analyzed by using descriptive quantitative method.*

*The optimum environment in order to produce lipase enzyme by using Candida W 3.8 is on 120 hours incubation time, temperature range in 27°C - 45°C and pH 7*

Keyword: *enzyme activity, Candida W 3.8, lipase, marine yeast*

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
Abstrak .....	iv
<i>Abstract</i> .....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Manfaat.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kawasan Mangrove Wonorejo Surabaya.....	5
2.2 <i>Marine Yeast</i> .....	5
2.3 Karakteristik <i>Candida</i> w 3.8 .....	6
2.4 Lipase .....	7
2.4.1 Karakteristik lipase pada <i>yeast</i> .....	8
2.4.2 Mekanisme katalis kerja enzim lipase .....	9
2.5 Aktivitas Lipase.....	10
2.6 Kondisi Yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase .....	10
2.6.1 Masa inkubasi.....	10
2.6.2 pH.....	11
2.6.3 Suhu.....	10
2.7 <i>p</i> -Nitrophenol .....	11
BAB III METODOLOGI .....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	13

3.2 Metode yang Digunakan.....	13
3.2.1 Peremajaan isolat.....	13
3.2.2 Pembuatan kurva pertumbuhan .....	14
3.2.3 Pembuatan starter isolat.....	14
3.2.4 Persiapan media produksi.....	14
3.2.5 Produksi enzim .....	14
3.2.6 Uji lipase.....	15
3.3 Analisa Data.....	16
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 17
4.1 Pertumbuhan <i>Candida</i> W 3.8.....	17
4.2 Optimasi Masa Inkubasi untuk Produksi Lipase dari <i>Candida</i> W.3.8.....	18
4.3 Optimasi pH dan Suhu untuk Produksi Lipase dari <i>Candida</i> W.3.8.....	20
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	 23
5.1 Kesimpulan.....	23
5.2 Saran.....	23
 DAFTAR PUSTAKA.....	 25
LAMPIRAN .....	31



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2. 1 Kerja Lipase.....	7
Gambar 2. 2 Mekanisme Kerja Lipase.....	9
Gambar 4. 1 Kurva Pertumbuhan <i>Candida</i> W 3.8.....	17
Gambar 4. 2 Aktivitas Lipase <i>Candida</i> W 3.8 dengan Variasi Masa Inkubasi.....	19
Gambar 4. 3 Aktivitas Lipase <i>Candida</i> W 3.8 dengan Variasi pH dan Suhu.....	20

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2. 1 Karakteristik Makroskopis <i>Candida</i> W 3.8 .....	6
Tabel 2. 2 Karakteristik Mikroskopis <i>Candida</i> W 3.8.....	6

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Pemanfaatan enzim dalam bidang industri modern telah berkembang cukup signifikan, hal ini dikarenakan teknologi enzim dapat dijadikan salah satu alternatif untuk menggantikan bahan kimiawi dalam bidang industri (Falch, 1999). Enzim pada bidang industri berfungsi sebagai biokatalis untuk mempercepat reaksi kimia dengan prinsip penurunan energi aktivasi (Lehninger, 1998). Dalam reaksi tersebut, enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk (Lehninger, 1982). Enzim digunakan sebagai biokatalis dikarenakan memiliki sifat khas dapat aktif pada jumlah sangat kecil dan kerjanya spesifik (Murni, 2011). Lipase merupakan salah satu enzim yang sering digunakan dalam bidang industri dan menjadi enzim komersial (Chi *et al*, 2006). Lipase pada industri modern digunakan dalam proses kimia organik, formulasi detergen, sintesis biosurfaktan, industri susu, kosmetik, kertas, dan farmasi (Liese, 2000). Lipase sering digunakan pada bidang industri dikarenakan memiliki transformasi kimia spesifik sehingga memiliki substrat yang spesifik dan stabil pada suhu tinggi (Liu, 2012)

Lipase dapat diproduksi oleh makhluk hidup baik hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme. Lipase yang berasal dari hewan atau tumbuhan dianggap kurang efektif dikarenakan bergantung variasi musim, konsentrasi hasil rendah, dan biaya prosesnya relatif tinggi. Produksi lipase dari mikroorganisme dianggap efektif dikarenakan pertumbuhannya cepat, tidak bergantung musim, dan mudah untuk dikembangkan (Godfrey, 1983). Salah satu kelompok mikroorganisme yang mampu memproduksi lipase adalah *marine yeast*

Sebagian besar enzim lipase yang dihasilkan oleh *marine yeast* merupakan enzim ekstraseluler. Salah satu contoh genus *marine yeast* penghasil lipase ekstraseluler berasal dari Genus

*Candida* (Wang *et al*, 2007). Secara umum lipase dari *marine yeast* seperti *Candida* memiliki keunggulan yaitu mampu menghidrolisis dan mensintesis berbagai jenis minyak dan bekerja pada rantai panjang ester (Sharma, 2001). Genus *Candida* juga mampu menghidrolisis triasilgliserol non spesifik yang banyak dijumpai di alam. Contoh spesies *Candida* yang mampu menghasilkan lipase ekstraseluler antara lain *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida deformans* CBS 2071, *Candida curvata* (Vakhlu, 2006). Hal ini menunjukkan bahwa *marine yeast* memiliki potensi yang besar di bidang industri (Chi *et al*, 2006)

Produksi lipase *marine yeast* dapat ditentukan melalui pengukuran aktivitas enzimnya. Uji aktivitas lipase adalah kemampuan enzim lipase dalam menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol (Begam, 2012). Aktivitas lipase dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan untuk menghasilkan aktivitas lipase tertinggi (Bindiya, 2012). Faktor lingkungan tersebut antara lain masa inkubasi, pH, dan suhu.

Masa inkubasi berpengaruh pada aktivitas lipase yang dihasilkan oleh *marine yeast* dikarenakan berkaitan dengan kondisi optimal *marine yeast* untuk tumbuh dan menghasilkan lipase. Berdasarkan Babu (2007) genus *Yarrowia* memiliki kondisi optimal dalam menghasilkan lipase pada masa inkubasi 96 jam. Masa inkubasi lebih dari empat hari mempengaruhi kondisi pertumbuhan *marine yeast* dikarenakan penurunan nutrisi pada media produksi

Faktor kondisi lingkungan lainnya yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah pH. pH yang terlalu basa atau asam menyebabkan terjadinya ikatan OH atau H pada sisi aktif enzim, hal ini membuat enzim tidak mampu berfungsi (Iftikhar *et al*, 2008). Contoh dari beberapa genus seperti Genus *Geotrichum* mampu aktif menghasilkan lipase yang stabil pada pH 4,2 - 9,8. Genus lainnya yaitu *Yarrowia* mampu memproduksi lipase stabil pada pH 4,5-8 (Ota *et al* 1982). Berdasarkan Paskevicius (2001) aktivitas lipase tertinggi umumnya dihasilkan pada rentang 4-10.

Suhu merupakan faktor penyebab enzim terdenaturasi atau inaktif (Iftikhar *et al*, 2008). *Candida* mampu menghasilkan enzim lipase dan stabil pada suhu 27°C-55°C (Tsujisaka *et al*, 1973).

Hasil penelitian terdahulu (Alami dan Shovitri, 2015) telah didapatkan isolat *marine yeast* yang memiliki potensi terbaik secara kualitatif dan kuantitatif dalam mendegradasi lipid, akan tetapi studi terkait optimasi kondisi lingkungan untuk produksi lipase dari *marine yeast* tersebut belum diungkap. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan pada optimasi kondisi lingkungan (masa inkubasi, pH, dan suhu) media produksi dari *Candida* W 3.8

## 1.2 Permasalahan

Permasalahan yang diangkat dalam penelitian ini adalah bagaimana variasi kondisi lingkungan (masa inkubasi, pH, dan suhu) media yang optimal untuk produksi lipase pada *Candida* W 3.8 ?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kondisi lingkungan optimal untuk produksi lipase dari *Candida* W 3.8

## 1.4 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Isolat yang digunakan adalah *Candida* w.3.8. Isolat tersebut merupakan isolat terbaik dari hasil uji potensi secara kualitatif dan kuantitatif dari penelitian sebelumnya
2. Produksi enzim diukur dengan uji aktivitas enzim
3. Parameter kondisi lingkungan yang digunakan terdiri atas pH, suhu, dan masa inkubasi
4. Rentang pH yang digunakan adalah 4,5 ; 7; dan 10
5. Rentang suhu yang digunakan adalah 27°C, 45°C, dan 55°C
6. Masa inkubasi adalah 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam, 168 jam, dan 192 jam

### **1.5 Manfaat**

Manfaat penelitian ini adalah hasil variasi kondisi lingkungan terbaik dalam media produksi lipase yang telah diperoleh dapat digunakan untuk meningkatkan produksi lipase dari *marine yeast* yang dapat diaplikasikan untuk berbagai keperluan

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kawasan Mangrove Wonorejo Surabaya**

Lokasi Mangrove Wonorejo Surabaya terletak di kecamatan Rungkut Surabaya, tepatnya didesa Wonorejo kotamadya Surabaya atau terdapat di bagian pantai timur Surabaya. Kawasan Mangrove di daerah pantai timur Surabaya memiliki ketebalan 5-20 meter dan menutup 8,7 km dari 28,5 km panjang garis pantai. Jenis mangrove yang terdapat di daerah ini adalah *Avicennia marina*, *Avicennia alba*, *Sonnerantia ovata*, *Sonnerantia caseolaris*, dan *Rhizophora mucronata* dengan pembagian zonasi pada muara sungai didominasi *Sonneratia ovata* dan *Sonneratia alba*, pada bagian dalam hutan didominasi golongan *Avicennia* (Nurdin, 2011)

#### **2.2 Marine Yeast**

*Marine yeast* adalah salah satu agen yang berpengaruh dalam proses ekologis di perairan laut, seperti biodegradasi senyawa minyak (Kotabakae *et al.*, 1992). Genera yang paling sering didapatkan di wilayah perairan adalah *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Candida*, dan *Debaryomyces* (Kutty *et al*, 2008). Menurut Munn (2004) jenis *yeast* yang ditemukan secara umum di perairan dangkal berasal dari kelas Ascomycetes (misalnya : *Candida*, *Pichia*, dan *Saccharomyces*), sedangkan di perairan dalam berasal dari kelas Basidiomycetes (misalnya *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, dan *Sporobolomyces*).

Morfologi *marine yeast* memiliki ukuran berkisar antara 1 hingga 5  $\mu\text{m}$  lebarnya dan panjangnya 5 hingga 30  $\mu\text{m}$ , tidak terdapat flagelum, dan beberapa ditutupi oleh kapsul (Pelczar *et al*, 1986). *Marine yeast* cenderung toleran dengan adanya antibiotik, serta beberapa jenis mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan mold. Sifat lainnya adalah lebih toleran dengan lingkungan stress (garam, asam, dan gula) (Balía, 2004)



*Marine yeast* selain memiliki kemampuan toleran antibiotik, terdapat spesies yang mampu menghasilkan enzim lipase. *Marine yeast* yang di kultur di media mengandung minyak mampu menghasilkan lipase (Wang *et al*, 2007). *Marine yeast* memiliki beberapa genus yang mampu menghasilkan lipase antara lain *geotrichum*, *trichosporon*, dan *candida* (Chi *et al*, 2006).

### 2.3 Karakteristik *Candida* W 3.8

Pengamatan karakteristik yeast terdiri atas karakterisasi makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi yeast ini nantinya dapat digunakan untuk mengetahui karakter, potensi, dan sistematikanya. Isolat yang digunakan untuk pengujian aktivitas lipase adalah isolat *Candida* W 3.8. Isolat *Candida* W 3.8 merupakan isolat koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi yang diisolasi dari kawasan Mangrove Wonorejo, Surabaya. Isolat ini telah diamati secara makroskopis dan mikroskopis dengan hasil sebagai berikut

Tabel 2. 1 Karakteristik Makroskopis *Candida* W 3.8

<i>Shape</i>	<i>Testure</i>	<i>Color</i>	<i>Edge</i>	<i>Elevasi</i>	<i>Surface</i>	<i>Size (cm)</i>
<i>Irregular</i>	<i>Membranous</i>	<i>White</i>	<i>Filiform</i>	<i>Raised</i>	<i>Ridgid</i>	0,5-08

Tabel 2. 2 Karakteristik Mikroskopis *Candida* W 3.8

<i>Cell Shape</i>	<i>Size (µm)</i>	<i>Budding</i>	<i>Pseudohifa (√)</i>	<i>Hifa (√)</i>
Oval	2,6 x 2,8	Multilateral	√	-

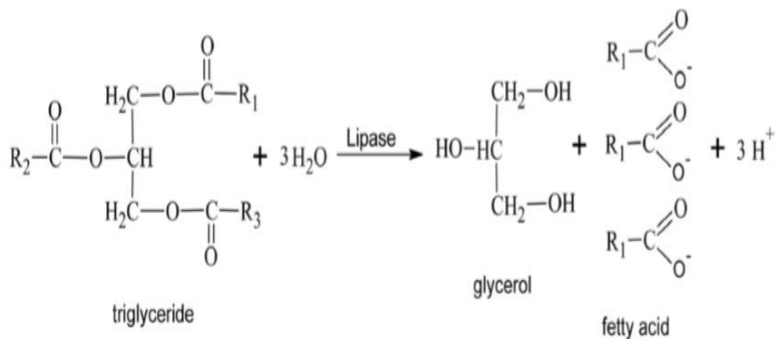
(Nasihah, 2015)

Hasil karakteristik secara makroskopis dan mikroskopis menunjukkan ciri-ciri isolat w 3.8 mendekati karakteristik *Candida*, yaitu dengan ciri-ciri *shape irregular*, *testure*

*membranous, color white, edge filiform, elevasi raised, surface rigid, cell shape oval, tipikal budding multilateral*, memiliki pseudohifa, namun tidak memiliki hifa sejati (Nasihah, 2015)

## 2.4 Lipase

Enzim merupakan protein yang mampu mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia yang memiliki ciri-ciri memiliki spesifitas substrat. Enzim mampu mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia tanpa pembentukan produk sampingan, pada reaksi tersebut dihasilkan produk (Lehninger, 1982). Salah satu jenis enzim adalah lipase



Gambar 2. 1 Kerja Lipase

Lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim kelas hidrolase, yang bekerja dalam hidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol (Ciafardini, 2006). Lipase memiliki berat molekul dari 20.000 sampai 60.000 (Fogarty, 1983).

Lipase akan memecah emulsi ester pada gliserin dan asam lemak rantai panjang seperti triolein dan tripalmitin (Sharma, 2001). Gambar 2.1 menunjukkan triasilgliserol (TAG) dipecah oleh lipase menjadi gliserol (DAG) dan asam lemak bebas. DAG

adalah ester gliserol dengan dua molekul asam lemak (Lason, 2010).

Lipase pada media organik mampu mengubah proses enzimatis sehingga mampu melakukan transesterifikasi dan sintesis reaksi lainnya pada jenis lipid baru (Lason, 2010). Lipase pada mikroorganisme memiliki sekuens protein Ser-His-Asp/Glu yang bergabung dengan serin dari protease (Asp-His-Ser pada *subtilisin family*, His-Asp-Ser pada *chyrnotrypsin family*). Katalisis serin pada lipase biasa diidentifikasi pada sekuens Gx5Xg (Boel, 1988)

#### 2.4.1 Karakteristik Lipase pada *Yeast*

Karakteristik lipase pada yeast memiliki kondisi suhu lebih stabil, enzim yang dihasilkan merupakan enzim ekstraseluler, dan mampu bertahan pada salinitas cukup tinggi (Vakhlu, 2006). Enzim lipase yang diproduksi oleh *marine yeast* mampu menghidrolisis dan mensintesis dengan rentang ester yang cukup panjang, serta mampu aktif menghidrolisis berbagai tipe rantai minyak (Chi *et al*, 2006). Menurut penelitian Wang (2007) kondisi optimum produksi lipase secara *in vivo* dari *marine yeast* tidak berbeda jauh dengan kondisi optimum dari *terrestrial yeast* yaitu pada suhu 40 °C dan pH 6-8,5

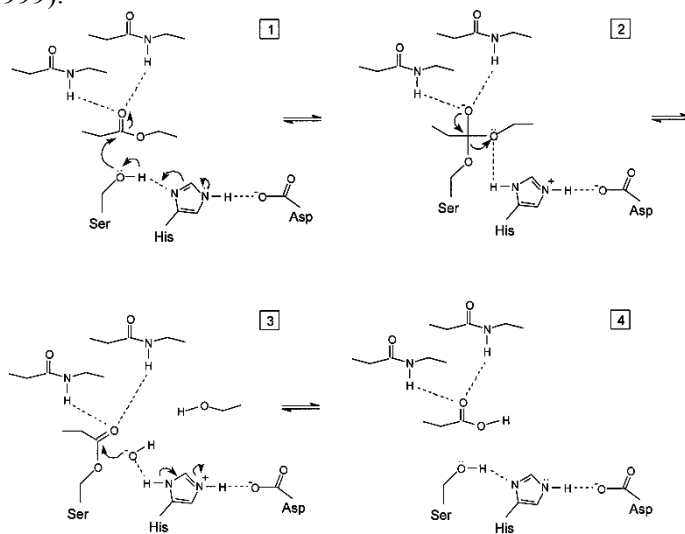
Lipase pada *yeast* genus *Candida* termasuk dalam jenis famili  $\alpha/\beta$  hydrolase. Grup ini menunjukkan golongan enzim yang membagikan *similar fold* dengan penghubung yang identik pada pusat  $\beta$ -sheet, meskipun tidak seluruh sekuens homolog mampu dideteksi (Uppenberg, 1994).

Jenis lipase pada genus *Candida* memiliki kerja non spesifik pada trigliserida dan pada suhu termofilik (Michiyo, 1989). Kondisi ini disebabkan genus *Candida* memiliki dua tipe lipase yang sering disebut Lipase A dan Lipase B, keduanya memiliki perbedaan isoelektrik poin dan berat molekul (Heldt-Hansen, 1989). Tipe Lipase A memiliki sifat non spesifik dan lebih stabil pada kondisi termofilik. Tipe Lipase A memiliki berat molekul 45 kDa dan pi 7,5. Tipe Lipase B (CALB) memiliki berat molekul

33 kDa dan  $p_i$  6,0. Lipase B mampu bekerja baik pada proses hidrolisis yang bersifat stereo spesifik pada sintesis organik, selain itu dapat berpotensi pada sintesis glucolipid (Adelhorst, 1990)

### 2.4.2 Mekanisme Katalis Kerja Enzim Lipase

Lipase merupakan serin hirolase yang mengandung sequens  $G-X_1-S-X_2-G$  sebagai agen katalitik, G glycine, S serine,  $X_1$  histidine dan  $X_2$  asam glutamat atau aspartat (Saxena *et.al.*, 2003). Lipase bertindak atas obligasi ester karboksil yang memecah acylglycerols menjadi asam lemak dan gliserol (Jaeger *et.al.* 1999).



Gambar 2. 2 Mekanisme Kerja Lipase

Gambar 2.2 menerangkan mekanisme reaksi lipase yaitu sebagai berikut [1] Ikatan lipid, aktivasi nukleofilik serin residu oleh histidin dan pengikatan nukleofilik dari substrat atom karbon karbonil oleh Ser  $O^-$ . [2] Terbentuk Transient tetrahedral, penyetabilan  $O^-$  oleh dua peptida NH. Histidin melepaskan proton sehingga ikatan gugus alkohol pada substrat terlepas. [3] Ikatan

kovalen berpindah ke bagian tengah (*enzyme acyl*) sehingga residu serin mengesterifikasi komponen asam dari substrat. Residu histidin mengaktifkan molekul air membentuk ion hidroksil. Ion hidroksil yang dihasilkan melakukan pengikatan nukleofilik pada atom karbon karbonil dari kovalen. [4] Residu histidin memberikan proton pada atom oksigen yang berasal dari residu serin aktif, sehingga terjadi degradasi komponen *acyl*, menyebabkan *acyl* terlepas (Jaeger *et.al.* 1999).

## 2.5 Aktivitas Lipase

Produksi lipase *marine yeast* dapat ditentukan salah satunya melalui pengukuran aktivitas enzimnya. Uji aktivitas lipase adalah kemampuan enzim lipase dalam menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol (Begam, 2012). Aktivitas lipase adalah uji dengan monitoring pelepasan asam lemak atau gliserol dari triasilgliserol atau ester asam lemak yang bekerja pada permukaan air atau minyak, proses hidrolisis membentuk partikel yang terdapat di dalam larutan, partikel yang tertangkap oleh cahaya spektrofotometer adalah jumlah asam lemak yang terlepas dari ikatan ester pada triasilgliserol (Gupta, 2003).

Aktivitas Lipase diukur dengan rumus

$$\frac{\mu\text{mol pNP}}{t(\text{waktu})} \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

1.  $\mu\text{mol pNP}$  merupakan konsentrasi Pnp
2.  $t$  merupakan terjadinya reaksi
3. Faktor pengenceran merupakan jumlah pengenceran yang digunakan dalam reaksi
4. Satuan aktivitas enzim adalah  $\text{Unit/ml} = \frac{\mu\text{M/Menit}}{\text{ml}}$

Aktivitas lipase yang diujikan merupakan aktivitas per unit (U) pada aktivitas lipase ditunjukkan dalam  $1 \mu\text{mol p-nitrophenol}$  per menit dalam kondisi perlakuan (Vitisant, 2013).

## 2.6 Kondisi yang Mempengaruhi Aktivitas Lipase

Aktivitas lipase dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan antara lain:

### 2.6.1 Masa Inkubasi

Masa inkubasi mempengaruhi aktivitas lipase. Babu dan Rao (2007) aktivitas lipase maksimum pada masa inkubasi setelah empat hari, inkubasi setelah empat hari aktivitas lipase berkurang dikarenakan kandungan akumulasi metabolit yang dihasilkan oleh mikroba mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang lainnya (Bao dan Rao, 2007)

### 2.6.2 pH

Aktivitas lipase pada mikroorganisme khususnya *marine yeast* optimum pada pH 6 dan 7, terdapat lebih dari 80% lipase yang dihasilkan beberapa *marine yeast* memiliki toleran dengan pH asam yaitu berkisar 3-7, selain itu juga terdapat kurang dari 60% aktivitas lipase stabil di kondisi pH basa (Vitisant, 2013). Penelitian lain yaitu Paskevicius (2001) pada 155 strain yeast yang diujikan untuk menghasilkan aktivitas lipase, dihasilkan 26 strain yeast di pH 5,5 (asam), 18 strain yeast di pH 7 (netral), dan hanya 8 strain yeast di pH 9,5 (basa). Aktivitas tertinggi menghasilkan lipase pada pH 7 (netral) jenis spesies *Candida lipolytica* sebesar  $8,2 \pm 0,09$  Unit /mL

### 2.6.3 Suhu

Aktivitas lipase *yeast* berdasarkan Vitisant (2013) memiliki kondisi optimum pada suhu 37 – 40°C, namun beberapa jenis yeast sebanyak lebih dari 85% mampu toleran hingga 70°C, dan terdapat kurang dari 10% mampu toleran pada suhu 80°C dan 90°C. Perubahan suhu mempengaruhi reduksi kandungan nutrisi selama aktivitas lipase (Babu dan Rao, 2007)

## 2.7 *p*-Nitrophenol

*p*-Nitrophenol merupakan senyawa kromogenik yang digunakan untuk mengukur aktivitas lipase pada kultur mikroba atau preparasi enzim dengan prinsip kolometri. Penggunaan

kolometri lebih mudah dan cepat dibandingkan metode lain seperti fluorimetri, dikarenakan hasil dapat langsung diketahui (Feller *et al*, 1991 , Margesin, 2001).

*p*- Nitrophenol memiliki ikatan ester yang akan mengikat hasil hidrolisis dari aktivitas lipase (Margesin, 2001). Aktivitas lipase dapat ditentukan dengan jumlah *yellow chromogen* (*p*-nitrophenol) hasil dari pengikatan substrat yang telah dihidrolisis (Abd-Elhakeem, 2013). *p*-Nitrophenol memiliki berat molekul 139,11 dengan rumus kimia  $O_2NC_6H_4OH$ . Proses pengujian pada uji aktivitas lipase menggunakan salah satu jenis *p*-Nitrophenol yaitu *p*-Nitrophenyl Palmitate. *p*-Nitrophenyl Palmitate merupakan substrat yang akan dipecah oleh lipase menjadi *p*-Nitrophenol. Uji ini memiliki kendala yaitu reaksi aktivitas enzim tidak mampu dideteksi dikarenakan sulitnya absorbansi *p*-Nitrophenol pada pH asam. pH asam yang terbentuk akibat reaksi enzimatik dapat diatasi dengan pemberian larutan pH tinggi agar *p*-Nitrophenol mampu terabsorbansi dan tertangkap oleh spektrofotometer (Gupta, 2003)

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2016 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopemeber (ITS)

### **3.2 Metode yang Digunakan**

Penelitian ini diawali dengan peremajaan genus *Candida* W3.8 pada medium (*Yeast Malt Extract Agar*) YMEA. Isolat diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Isolat yang telah disubkultur diinokulasi ke dalam media *Yeast Malt Broth* (YMB), dilanjutkan pembuatan kurva pertumbuhan 192 jam. Proses selanjutnya media prekultur stater isolat dan media produksi disiapkan dengan variasi kondisi lingkungan, inokulum dari YMB dimasukkan ke dalam media prekultur starter isolat pada panjang gelombang 600 nm dan nilai *Optical Density* (OD) 0,5, lalu diinkubasi selama 18 jam, inokulum tersebut digunakan sebagai starter. Starter dimasukkan ke dalam media produksi dengan variasi kondisi lingkungan yang digunakan antara lain masa inkubasi, pH, dan suhu. Tahapan berikutnya adalah tahapan produksi lipase untuk mengetahui aktivitas lipase yang terkandung dalam isolat.

#### **3.2.1 Peremajaan Isolat**

Isolat *Candida* W 3.8, merupakan koleksi *yeast* milik Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS ditumbuhkan pada medium steril YMEA miring. Isolat diinokulasi dengan metode streak secara aseptis dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu ruang. Isolat yang telah disubkultur dianggap berhasil ditandai dengan pertumbuhan koloni pada bekas goresan medium (Prescott, 2002).



### 3.2.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Isolat dari *marine yeast* yang telah diinkubasi 48 jam diambil beberapa ose untuk disuspensikan kedalam air fisiologis 0,85% dan dihitung nilai OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga didapatkan nilai 0,5. Inokulum yang telah didapatkan dimasukkan 25 mL kedalam 225 mL medium YMB. Inokulum diinkubasi selama 192 jam pada suhu ruang, medium yang telah berisi inokulum di letakkan pada *rotary shaker*. Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara pengukuran pertumbuhan setiap 24 jam selama 264 jam dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 600 nm. Setelah diketahui fase pertumbuhannya, maka umur inkubasi starter dapat ditentukan

### 3.2.3 Pembuatan Starter Isolat

Isolat dari *marine yeast* yang telah diinkubasi 48 jam diambil beberapa ose untuk disuspensikan kedalam air fisiologis 0,85% dan dihitung nilai OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan menghasilkan nilai absorbansi 0,5. Inokulum 10% dari air fisiologis dimasukkan kedalam media produksi selama 48 jam. Waktu inkubasi ditentukan dari tahapan sebelumnya, setelah 48 jam starter siap digunakan

### 3.2.4 Persiapan Media Produksi

Medium produksi terdiri atas basal media sebanyak 100 mL yang terdiri dari glukosa 0,2 %, pepton 0,05 %, minyak zaitun 1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 0.07\text{H}_2\text{O}$  0.01%, *gum arabic* 0.1% (Sharma, 2014). Medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

### 3.2.5 Produksi Enzim

Isolat yang telah ditumbuhkan pada media starter, selanjutnya diambil sebanyak 15 ml dan dimasukkan kedalam 135 ml media produksi, selanjutnya Isolat diinkubasi dengan

variasi kondisi lingkungan (masa inkubasi, pH, dan suhu) pada *rotary shaker*. Setelah itu inokulum diambil 10 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm, selama 10 menit, proses ini berfungsi untuk memisahkan filtrat dengan supernatan. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak *crude enzim* yang selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas lipase

#### **a. Optimasi Masa inkubasi**

Media produksi yang telah diberi inokulum diberi label, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, 48 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam, 168 jam, dan 192 jam. Hasil masa inkubasi dengan uji aktivitas lipase tertinggi digunakan sebagai masa inkubasi pada optimasi pH dan suhu

#### **b. Optimasi pH dan Suhu**

Media produksi yang telah diberi inokulum diberi kombinasi 3 perlakuan, yaitu perlakuan pertama diberi kondisi lingkungan pH 4 dan diinkubasi pada suhu 27°C, 45°C, dan 55°C. Perlakuan kedua kondisi lingkungan pH 7 dan diinkubasi pada suhu 27°C, 45°C, dan 55°C. Perlakuan ketiga kondisi lingkungan pH 10 dan diinkubasi pada suhu 27°C, 45°C, dan 55°C

### **3.2.6 Uji Lipase**

#### **a. Kurva *p*-nitrophenol**

Kurva *p*-nitrophenol dibuat dengan cara sebagai berikut. Larutan *p*-nitrophenol 0,01 M dibuat dengan melarutkan 14 mg serbuk *p*-nitrophenol dengan akuades sebanyak 10 mL. Larutan *p*-nitrophenol ini merupakan larutan stok untuk pembuatan larutan dengan konsentrasi lebih kecil. Selang konsentrasi yang digunakan dalam penelitian adalah 300 µM, 500 µM, 700 µM, 900 µM, 1100 µM, 1300 µM (Sigma-Aldrich, 2013)

#### **b. Uji Aktivitas Lipase**

Aktivitas lipase pada kultur diukur dengan *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) sebagai substrat. Pertama dibuat larutan A (15

mg Pnpp dilarutkan kedalam 5 ml isopropanol) dimasukkan kedalam 45 ml larutan B (0,05 gram Gum Arabic dan 0,2 ml Triton X-100 dilarutkan kedalam 50 Mm buffer Tris-HCL pH 8.0), seluruh bahan dihomogenkan hingga volume akhir sebanyak 50 ml (Ertugul *et.al.*,2007). Aktivitas lipase diukur dengan mencampur 1,8 ml larutan substrat dengan 0,2 ml crude enzim dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometr dengan  $\lambda$  410 nm. Aktivitas per unit (U) pada aktivitas lipase ditunjukkan dalam 1  $\mu$ mol p-nitrophenol per menit dalam kondisi perlakuan (Vitisant, 2013).

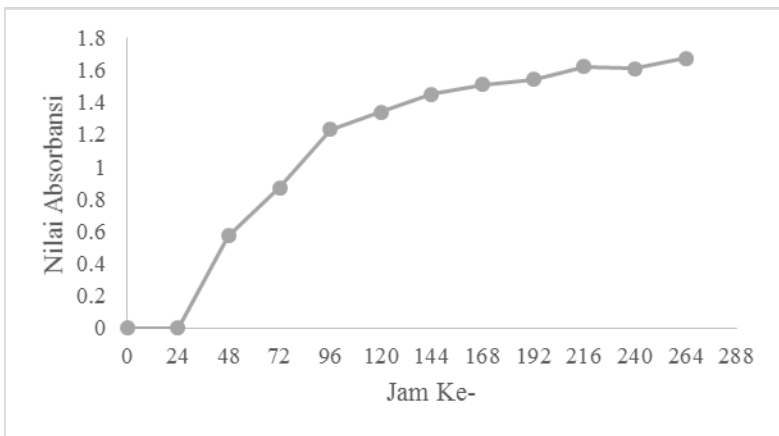
### 3.3 Analisa Data

Desain penelitian menggunakan kombinasi perlakuan antara dua faktor. Faktor yang digunakan adalah pH (4,7, dan 10) dan suhu (27°C, 45°C, 55°C). Data yang diperoleh dari perlakuan tersebut akan dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Kombinasi perlakuan yang menghasilkan aktivitas lipase tertinggi dipilih sebagai kondisi paling optimum untuk produksi lipase. Selanjutnya hasil data suhu dan pH di uji dengan 2 *sample T test* untuk membuktikan ada tidaknya perbedaan yang bermakna dari hasil kedua uji

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pertumbuhan *Candida* W 3.8

Pertumbuhan pada mikroba dapat ditandai oleh pertambahan jumlah sel dan atau massa sel. Salah satu cara untuk melihat pertumbuhan mikroba melalui massa sel secara langsung adalah dengan menggunakan perhitungan kekeruhan atau nilai *Optical Density* (OD). Hubungan antara massa sel dengan waktu pertumbuhan dapat dinyatakan dalam kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan terdiri atas beberapa fase antara lain fase lag, fase log, fase stasioner, dan fase *death* (kematian) (Fardiaz, 1992)



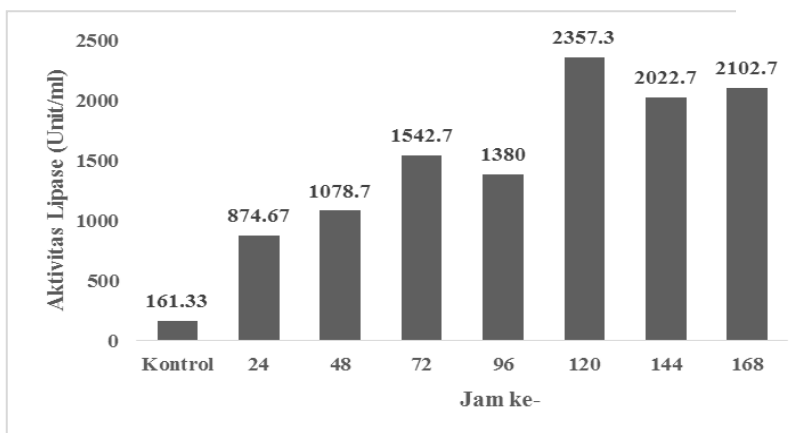
**Gambar 4.1** Kurva Pertumbuhan *Candida* W 3.8

Gambar 4.1 menunjukkan kurva pertumbuhan *Candida* W 3.8. Kurva Pertumbuhan tersebut terdiri atas beberapa fase yaitu fase lag, fase log, dan fase stasioner. Fase lag terjadi pada hari ke nol hingga hari pertama. Fase lag adalah fase penyesuaian *yeast* dengan kondisi substrat. Sel *yeast* belum mengalami pembelahan, namun metabolisme kimiawinya telah aktif

(Ginovart, 2011). Ciri lain dari fase lag adalah tidak ada pertumbuhan populasi, terjadi perubahan komposisi kimiawi pada sel, ukuran sel bertambah, dan substansi intraselulernya bertambah (Pelczar, 1986). Fase lag memungkinkan beberapa sel akan mati dikarenakan tidak mampu menyesuaikan dengan lingkungan baru (Pommerville, 2013). Fase selanjutnya adalah fase log yang terjadi setelah hari pertama hingga hari ke lima. Fase log merupakan fase sel *yeast* yang telah mampu beradaptasi dengan lingkungan mediumnya. Sel akan membelah dengan laju konstan menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama. Pembelahan sel menjadi dua kali lipat dikarenakan kondisi nutrisi yang banyak (Pelczar, 1986), sehingga pada fase ini *yeast* yang telah beradaptasi mampu memanfaatkan nutrisi pada medium untuk digunakan dalam metabolisme sel atau dapat dikatakan seluruh proses metabolisme di dalam sel berada pada kondisi optimal (Pommerville, 2013). Sehingga fase log dipilih sebagai batas waktu inkubasi starter yang akan dimasukkan ke dalam medium produksi (Fardiaz, 1992). Fase terakhir yang dilewati oleh *Candida W 3.8* adalah fase stasioner. Fase stasioner terjadi pada hari keenam hingga hari kesebelas. Fase stasioner adalah fase dengan kondisi sel berhenti membelah dikarenakan kondisi sel yang tumbuh sama dengan sel yang telah mati (Pelczar, 1986). Pada fase ini sel berhenti melakukan aktivitas metabolisme, namun sel tersebut tidak mati (Gray, 2004). Sel berhenti untuk tidak membelah dikarenakan beberapa faktor antara lain nutrisi habis, adanya akumulasi metabolit toksik (misalnya alkohol), dan penurunan kadar oksigen (Purwoko, 2007).

#### **4.2 Optimasi Masa Inkubasi untuk Produksi Lipase dari *Candida W 3.8***

Optimasi masa inkubasi pada produksi lipase digunakan untuk mengetahui waktu optimal untuk dihasilkan aktivitas lipase paling tinggi



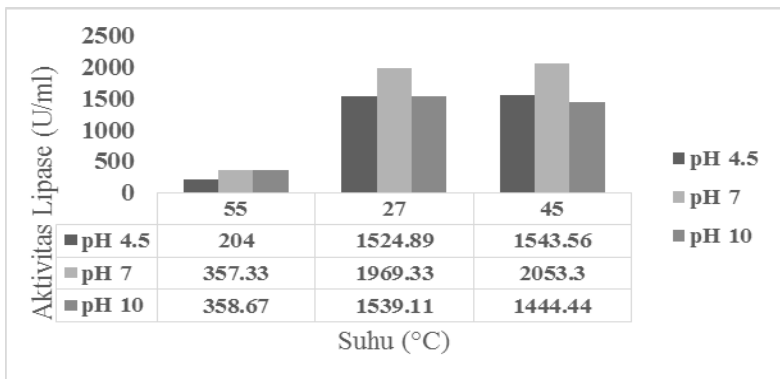
**Gambar 4.2** Aktivitas Lipase *Candida* W 3.8 Variasi Masa Inkubasi

Hasil dari penelitian optimasi produksi lipase dari *Candida* W 3.8 dengan variasi masa inkubasi didapatkan hasil pada kontrol bernilai 161,33 U/ml, jam ke 24 bernilai 874,67 U/ml, jam ke 48 bernilai 1078,7 U/ml, jam ke 72 bernilai 1542,7 U/ml, jam ke 96 bernilai 1380 U/ml, jam ke 120 bernilai 2357,3 U/ml, jam ke 144 bernilai 2022,7 U/ml, jam ke 168 bernilai 2102,7 U/ml. Saat jam ke 24 hingga jam ke 120 menunjukkan *trend* peningkatan aktivitas enzim lipase. Hal ini kemungkinan dikarenakan adanya peningkatan jumlah sel *yeast* yang berkorelasi dengan produksi enzim (Bora, 2012). Peningkatan aktivitas enzim lipase juga dapat disebabkan oleh masih tersedianya substrat dalam medium, sehingga terjadi hidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol oleh lipase yang dihasilkan *Candida* W 3.8. Faktor lainnya adalah kebutuhan sumber nutrisi. Sumber nutrisi terdiri dari sumber karbon, sumber nitrogen, dan ion kofaktor enzim. Sumber karbon digunakan sel *yeast* sebagai energi dalam proses metabolisme sel. Sumber nitrogen digunakan sebagai pembentukan sel dan pembentuk komponen DNA (Okafor, 2007). Ion-ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , dan  $\text{Mg}^{+}$ . Ion – ion tersebut digunakan sebagai kofaktor lipase yang mengaktifkan reaksi enzimatik lipase (Chi, 2009). Peningkatan

enzim lipase mencapai puncaknya hingga jam ke 120. Namun pada jam ke 144 aktivitas enzim lipase mengalami penurunan . Hal ini dapat disebabkan salah satunya karena penurunan konsentrasi substrat pada medium produksi, sehingga terjadi penurunan jumlah sel *yeast* yang berakibat penurunan produksi lipase. Faktor lain yang memicu penurunan aktivitas enzim disebabkan oleh hambatan metabolit yang dikeluarkan bersamaan dengan lipase yang dihasilkan seperti toksin (Okafoor, 2007). Pengukuran aktivitas lipase dengan variasi masa inkubasi dan menghasilkan nilai aktivitas enzim tertinggi akan digunakan sebagai masa inkubasi pada produksi lipase dengan variasi pH dan suhu.

#### 4.3 Optimasi pH dan Suhu untuk Produksi Lipase dari *Candida W 3.8*

Hasil optimasi produksi lipase dari *Candida W 3.8* dengan menggunakan variasi kombinasi pH (4,5; 7; 10) dan suhu (27°C, 45°C, 55°C) selama waktu inkubasi 120 jam ditampilkan pada Gambar 4.3. Nilai *Optical Density* (OD) yang diperoleh menggunakan spektrofotometer UV VIS 410 nm dimasukkan ke dalam rumus aktivitas enzim lipase



Gambar 4.3 Aktivitas Lipase *Candida W 3.8* dengan Variasi pH dan Suhu

Gambar 4.3 menunjukkan nilai aktivitas lipase (U/ml) oleh *Candida* W 3.8 pada variasi pH 4,5 dengan suhu 27°C bernilai 1524,89 U/ml, pH 4,5 dengan suhu 45°C bernilai 1543,56 U/ml, pH 4,5 dengan suhu 55°C bernilai 204 U/ml. Variasi pH 7 dengan suhu 27°C bernilai 1969,33 U/ml, pH 7 dengan suhu 45°C bernilai 2053,3 U/ml, pH 7 dengan suhu 55°C bernilai 357,33 U/ml. Variasi pH 10 dengan 27°C bernilai 1539,11 U/ml, pH 10 dengan suhu 45°C bernilai 1444,44 U/ml, pH 10 dengan suhu 55°C bernilai 358,67 U/ml. Gambar 4.3 menunjukkan aktivitas lipase yang lebih tinggi didapatkan dari suhu 45°C dan pH 7 serta suhu 27°C dan pH 7. Hasil uji statistik (Lampiran 8) didapatkan hasil bahwa tidak ada perbedaan signifikan dari hasil kedua uji sehingga dapat dikatakan bahwa *Candida* W 3.8 termasuk dalam *marine yeast* yang mampu menghasilkan aktivitas lipase optimal pada rentang suhu 27°C – 45°C dan pH 7. Berdasarkan Zaky (2014) *marine yeast* memiliki beberapa kelebihan yaitu tahan salinitas tinggi dan termotoleran, serta *marine yeast* khususnya *Candida* mampu menghasilkan lipase pada kisaran suhu 30°C – 40°C dan pH kisaran 6-8 (Chi, 2009)

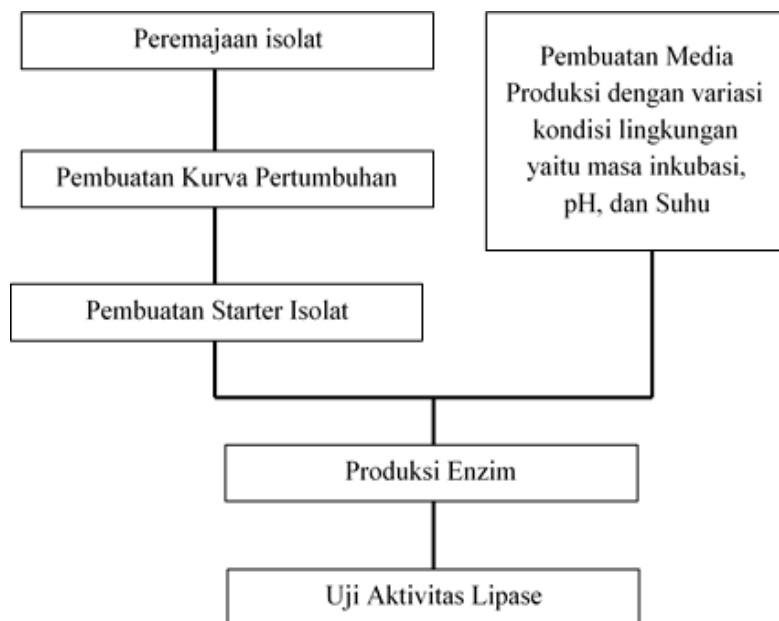
*Candida* W3.8 diasumsikan merupakan *yeast* termotoleran. Mikroorganisme yang toleran hidup dengan rentang suhu yang lebih luas akan menghasilkan metabolit sekunder pada keadaan suhu yang cukup luas. Mikroorganisme yang terbiasa pada suhu yang luas akan berubah struktur fisiologis sel membrannya dan seluruh metabolisme selnya. Pada mikroorganisme penghasil lipase, suhu berpengaruh terhadap lipase dikarenakan suhu mengatur regulasi sintesis enzim pada transkripsi mRNA hingga translasi protein. Hal ini dapat mempengaruhi peningkatan stabilitas produksi enzim dan protein. Mikroorganisme yang terbiasa hidup dengan karakteristik termotoleran akan menghasilkan lipase yang termotoleran (Bora, 2012)



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Skema Kerja



## Lampiran 2. Pembuatan 50 mM Tris-HCL

1. Pembuatan Stok Larutan Tris-HCL 0,5 M  
Bahan yang digunakan Tris-HCL dan NaoH

$$M = \frac{\text{Berat Tris - HCL}}{\text{Mr Tris - HCL}} \times \frac{1000}{\text{Volume}}$$

$$0,5 = \frac{\text{Berat Tris - HCL}}{157,6} \times \frac{1000}{50 \text{ ml}}$$

Berat Tris-HCL 3,94 gram

Tris-HCL sebanyak 3,94 gr dilarutkan kedalam aquades 20 ml, lalu ditambah NaOH sebanyak 2 ml untuk mendapatkan pH 8, selanjutnya ditambahkan aquades hingga 50 ml

2. Pembuatan Larutan Tris-HCL 50 mM  
Larutan stok Tris-HCL 0,5 M diambil 5 ml dan dilarutkan kedalam 45 ml aquades. Larutan buffer Tris-HCL 50 mM siap digunakan

### Lampiran 3. Kurva Standart p-Nitrophenol

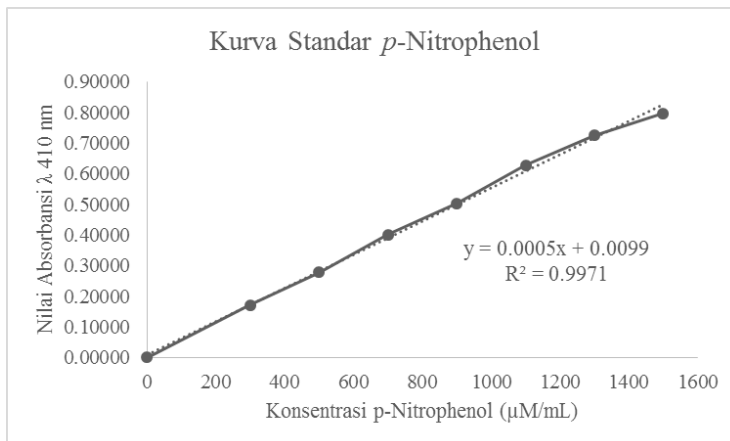
Kurva Standart p-Nitrophenol (Pnp) diawali dengan pembuatan larutan stok p-Nitrophenol (1 Mm) dengan perhitungan sebagai berikut :

$$M = \frac{\text{Berat pNP}}{\text{Mr pNP}} \times \frac{1000}{\text{Volume}}$$

$$(10 \times 10^{-2}) \text{ mM} = \frac{\text{Berat pNP}}{139,1} \times \frac{1000}{10 \text{ ml}}$$

Berat Pnp = 13,917 mg

Konsentrasi p-Nitrophenol ( $\mu\text{M/mL}$ )	Absorbansi ( $\lambda$ 410 nm)
300	0.17067
500	0.27800
700	0.40133
900	0.50333
1100	0.62800
1300	0.72467
1500	0.79667



#### Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Enzim

Aktivitas lipase (crude enzim) dari Candida W 3.8 dengan variasi pH 7 dan suhu 45°C

Kurva standart p-Nitrophenol,  $y = 0,0005x - 0,0099$

Nilai absorbansi ( $\lambda$  410 nm) = 1,540

Aktivitas Lipase (Unit/mL)

$$= \frac{\mu\text{mol pNP}}{t(\text{waktu})} \times \text{faktor pengenceran}$$

$$= \frac{3080,66}{15} \times 10$$

$$= 2053,7 \text{ Unit/mL}$$

Keterangan :

1. Pada persamaan kurva standar, y merupakan nilai absorbansi dan x merupakan konsentrasi Pnp
2. Nilai 0,0099 diabaikan
3. Faktor pengenceran

$$= \frac{\text{Total Volume}}{\text{Volum enzim}}$$

$$= \frac{2 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}}$$

$$= 10$$

4. Satuan aktivitas enzim adalah Unit/ml =  $\frac{\mu\text{M/Menit}}{\text{ml}}$

**Lampiran 5.** Nilai Absorbansi Kurva Pertumbuhan  
Candida W 3.8

Kurva Pertumbuhan diukur dengan Spektrofotometer UV-VIS  
 $\lambda 600$  nm

<b>Hari Ke-</b>	<b>Nilai Absorbansi</b>
0	0
1	0
2	0.570
3	0.869
4	1.232
5	1.340
6	1.451
7	1.509
8	1.542
9	1.623
10	1.611
11	1.674

**Lampiran 6.** Nilai Absorbansi dan Nilai Aktivitas Enzim Lipase Candida W 3.8 Variasi Masa Inkubasi

<b>Jam ke-</b>	<b>Nilai Absorbansi</b>	<b>Aktivitas Enzim (Unit/ml)</b>
0 (Kontrol)	0.121	161.33
24	0.656	874.67
48	0.809	1078.7
96	1.157	1542.7
120	1.035	1380
144	1.768	2357.3
168	1.517	2022.7
192	1.577	2102.7

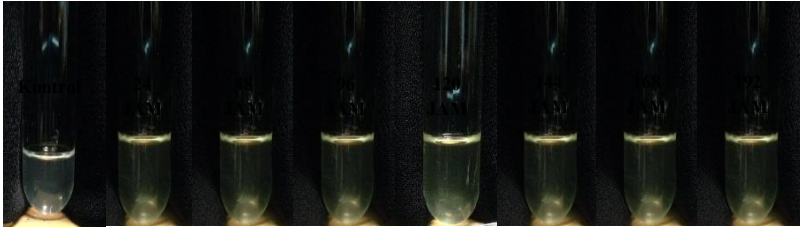
**Lampiran 6.** Nilai Absorbansi dan Nilai Aktivitas Enzim Lipase  
Candida W 3.8 Variasi pH dan Suhu

Parameter	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Rata Rata Absorbansi	Aktivitas Lipase (Unit/mL)
pH 4.5 Suhu 27°C	1.155	1.128	1.148	1.14367	1524.89
pH 7 Suhu 27°C	1.481	1.475	1.475	1.477	1969.33
pH 10 Suhu 27°C	1.154	1.155	1.154	1.15433	1539.11
pH 4.5 Suhu 45°C	1.157	1.158	1.158	1.15767	1543.56
pH 7 Suhu 45°C	1.48	1.569	1.572	1.54033	2053.78
pH 10 Suhu 45°C	1.085	1.086	1.079	1.08333	1444.44
pH 4.5 Suhu 55°C	0.263	0.094	0.102	0.153	204
pH 7 Suhu 55°C	0.262	0.266	0.276	0.268	357.333
pH 10 Suhu 55°C	0.168	0.169	0.47	0.269	358.667



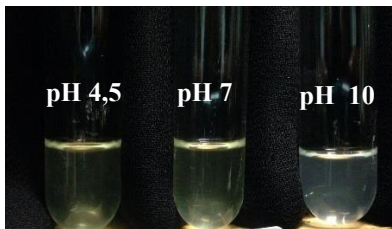
**Lampiran 7.** Foto Hasil Perlakuan Aktivitas Lipase

Foto Perlakuan Aktivitas Lipase Candida W 3.8 Variasi Masa Inkubasi

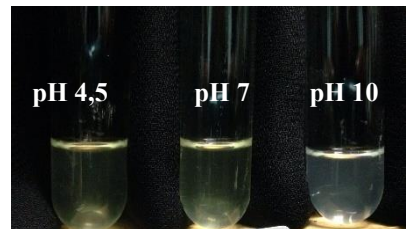


Hasil Perlakuan Aktivitas Lipase Candida W 3.8 Variasi Masa Inkubasi

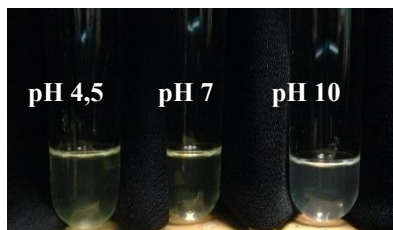
Foto Perlakuan Aktivitas Lipase Candida W 3.8 Variasi pH dan Suhu



Hasil Perlakuan Suhu 27°C



Hasil Perlakuan Suhu 45°C



Hasil Perlakuan Suhu 55°C

## Two-Sample T-Test and CI: Suhu 27; Suhu 45

Two-sample T for Suhu 27 vs suhu 45

	N	Mean	StDev	SE Mean
Suhu 27	3	1678	253	146
Suhu 45	3	1680	327	189

Difference =  $\mu$  (Suhu 27) -  $\mu$  (Suhu 45)

Estimate for difference: -3

95% lower bound for difference: -564

T-Test of difference = 0 (vs >): T-Value = -0.01 P-Value = 0.504 DF = 3

Hasil uji-t menunjukkan bahwa  $p\text{-value} > \alpha = 5\%$ , dapat dikatakan tidak terdapat perbedaan yang bermakna/signifikan antara hasil dari Suhu 27 dan Suhu 45

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian adalah diperoleh kondisi lingkungan optimal untuk produksi lipase dari *Candida* W 3.8 adalah pada masa inkubasi 120 jam, serta rentang suhu 27°C - 45°C dan pH 7

#### **5.2 Saran**

Saran penelitian selanjutnya sebagai berikut:

1. Penelitian ini diperlukan adanya uji lebih lanjut terkait kombinasi seluruh faktor lingkungan yang sudah ada atau diluar faktor lingkungan yang telah dilakukan.
2. Penelitian dapat dilanjutkan dengan pemurnian dan karakterisasi lipase

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elhakeem, M.A., Elsayed, A., dan Alkhulaqi, T. 2013. New Colometric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media. **American Journal of Analytical Chemistry**, 442 – 444
- Adelhorst, K., Bjorkling, F., Godtfredsen, S., dan Kirk, O. 1990. Enzyme catalyzed preparation of 6-O-Acglucopyranosides. **Synthesis** 2, 112-115
- Alami, N. H., Shovitri, M. 2015. **Laporan Akhir Penelitian Pemula. Studi Lanjut Marine Yeast Sebagai Biofertilizer Komersial.** Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya
- Babu, I.S., Rao, G.H. 2007. Optimization of Process Parameter for the Production of Lipase in Submerged Fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Research Journal of Microbiology** 2 (1): 88-93. Academic Journals
- Balia, R.L. 2004. **Potensi dan Prospek Yeast (khamir) dalam Meningkatkan Diversifikasi Pangan di Indonesia.** Departemen pendidikan nasional universitas padjadjaran. Bandung
- Begam, M.S., Pradeep, F.S., dan Pradeep, B.V. 2012. Production, Purification, Characteization, and Applications of Lipase from *Serratia marcescens* MMBBO5. **Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research**, Vol 5, Suppl 4, 237-245
- Bindiya, P., Ramana, T. 2012. Optimization of Lipase Production from An Indigenously Isolated Marine *Aspergillus sydowii* of Bay of Bengal. **J Biochem Tech** 3(5): 5203-5211
- Boel, E., Hüge-Jenser, B., Christens, M., Thim, L, dan Fiil, N.P. 1988. *Rhizomucor mieberi* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. **Lipids** 23, 701-706
- Bora, M., Bora, L. 2012. Optimization of Extracelullar Thermophilic Highly Alkaline Lipase from Thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from

Hotspring of Arunacha Pradesh, India. **Brazilian Journal of Microbiology** : 30-42

Chi Zhemming., Chi Zhe., Zhang, T., Liu, G., Li, J, dan Wang, X. 2009. Production, Characterization And Gene Cloning Of The Extracelullar Enzymes From The Marine-Derived Yeasts And Their Potential Applications. **Biotechnolog Advances** 27: 236-255

Ciafardini, G., Zullu, B.A, dan Iride, A. 2006. Lipase Production by Yeasts from Extra Virgin Olive Oil. **Food Microbiology** 23. 60-67

Daum, G., Lees, N.D, Bard, M, dan Dickson, R. 1998. Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 14, 1471-1510

Entrugul, S., Donmez, G., Takac, S., Isolation of Lipase Produsing *Bacillus* sp. from Olive Mill Wastewater and Improving its Enzyme Activity. **Journal of Hazardous Materials**. 149: 720-724

Falch, E.A. 1999. Industrial Enzymes Developments in Production and Application, **Biotech Adv**, 9:643-658

Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pangan** I. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

Feller, G., Thiry, M., Gerday, C. 1991. Nucleotide Sequence Of The Lipase Gene *lip3* From The Antartic Psychotroph *Moraxella* TA144. **Biochim Biophys Acta** Feb 16;1088(2) : 323-4

Fogarty, W.M. 1983. Microbial Amylases. In Microbial Enzymes and Biotechnology ed. **Applied Science Publishers**. London. pp 1-92

Ginovart, M., Prats, C., Portell, X., Silbert, M., 2011. Exploring The Lag Phase and Growth Initiation of A Yeast Culture by Means of An Individual-Based Model. **Food Microbiology** 28, 810-817

Godfrey, T, Reichelt, J. 1983. Edible oil, in Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. **The Nature Press**, New York, pp. 424-427

Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., Washburne., 2004. "Sleeping Beauty": Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, p. 187-206 Vol. 68, No.2

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2003. Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification, and Biochemical Properties. **Appl Microbial Biotechnol** 64: 763-781

Heldt-Hansen, H.P., Ishii, M. Patkar, S.A, Hansen, T.T, dan Eigived, P. 1989. Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. **ACS Symposium Series**. 389. pp. 157-172

Iftikhar, T., Niaz, M, Afzal, M., Haq, I., dan Rajoka, M.I. 2008. Maximization of Intracellular Lipase Production in a Lipase-Overproducing Mutant Derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A Kinetic Study. **Food Technol. Biotechnol.** 46 (4) 402-412

Jaeger, K-E., Dijkstra, B.W., dan Reetz, M.T. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipase. **Annu. Rev. Microbial.** 53: 315-51

Kakugawa, K., Shobayashi, M., Suzuki, O., dan Miyakawa, T. Purification and Characterization of a Lipase from the Glycolipid-Producing Yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. **Biosci. Biotechnol. Biochme**, 66 (5), 978-985

Kutty, N.S., Philip, dan Rosamma. 2008. **Marine yeasts a review**. Department of Marine Biology, Microbiology and Biochemistry, School of Ocean Science and Technology, Cochin University of Science and Technology, India: John Wiley & Sons, Ltd

Kotabakae, M., Kreger-van Rj, N.J.W., Placido, M.T.L.C., dan Van, U.N. 1992. Isolation of Proteolytic Psychrophilic Yeasts from Raw Sea Foods. **Lett. Appl. Microbiology** 14: 37-42

Lason, E., Ogonowski, J. 2010. Lipase-Characterization, Application and Methods of Immobilization. **Chemik**, 64 : 97-102



Lehninger, A.L. 1998. **Dasar- dasar Biokimia Jilid 1**. Diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaja. Jakarta: Erlangga

Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. 2000. **Industrial Biotransformation**. . Weinheim: Wiley-VC

Liu, C.H., Huang, C.C., Wang, Y.W., dan Chang, J.S, 2012. Optimizing Lipase Production from Isolated *Burkholderia* sp. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 42, 511-516

Margesin, R., Feller, G., Hmmerle, M., Stegner, U., dan Schinner, F. 2001. A Colometric Method for The Determination of Lipase Activity in Soil. **Biotechnology Leters** 24: 27-33

Michiyo, M. 1989. Purfication of Thermostable, Nonspesific Lipase From *Candida* sp. and Its Use In Tranesterification. WO Patent 8802775. **Chem. Abstr.** 110, 20529

Munn, C.B. 2004. **Marine Microbiology**. Garl and Science/BIOS Scientific Publishers : UK

Murni, S.R, Kholisoh, S.D., Tanti D.I., Petrissia, E.M, 2011. Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*. **Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”** Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia, Yogyakarta

Nasihah, L. 2015. Potensi Yeast dari Kawasan Mangrove Wonorejo dalam Mndegradasi Selulosa dan Lipid. **Tugas Akhir**. Jurusan Biologi, FMIPA, ITS

Nelson, D.L, Michael, M.C. 2007. **Principles of Biochemistry** Fourth Edition, W H.

Okafoor, N. 2007. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. **Science Publishers**. Department of Biology Sciences, Clemson University. USA

Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., dan Minoda, Y. 1982. Purification and Some Properties of Cell-bound Lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. **Agricultural and Biological Chemistry** 29 Vol. 46, p. 2885-2893

Paskevicius, A. 2001. Lipase Activity of Yeast and Yeast like Fungi Functioning Under Natural Conditions. **Biologica** 4: 16-18.

Pelczar, M.J., dan Pelczar, M.F. 1986. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Diterjemahkan oleh R.S hadioetomo, T. Imas, S.S. Tjitrosoepomo, S.L, Angka. UI Press. Jakarta

Pera, L.M., Romero, C.M, Baigori, M.D, Castro, G.R, 2006. Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. **Food Technol. Biotechnol.** 44(2) 247-252

Pommerville, J.C. 2013. **Fundamental of Microbiology**. Body Systems Edition. Jones and Bartlett Learning. United States of America

Prescott, Harley. 2002. **Laboratory Exercise in Micobiology: Fifth Edition**. The McGraw-Hill. USA.

Purwoko, T. 2007. **Fisologi Mikroba**. Bumi Aksara : Jakarta

Saxena, R.K, Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S. 2003. Purification Strategies for Microbial Lipases. **Journal of Microbial Methods** 52: 1-18

Sharma, D., Kumbhar, B.K, Verma, A.K., Tewari, L., 2014. Optimization Of Critical Growth Parameters For Enhancing Extracellular Lipase Producyion By Alkalophilic *Bacillus* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnonology**

Sharma, R., Chisti, Y., dan Banerjee, U.C. 2001. Production, Purification, Characterization and Applicatiosn of Lipases. **Biotechnology Advances** 19: 627-662

Sigma-Aldrich Protocol. 2013. **Product Information Alkaline Buffer Solution 1.5 M, pH 10.3 (25 °C)**. Spruce street, St. Louis. USA.

Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., dan Jones, T.A. 1994. The Sequence, Crystal Structure Determination and Refinement of Two Crystal Forms of Lipase B from *Candida antarctica*. **Structure** Vol 2 No 4. Current Biology ISSN 0969-2126

Vakhlu, J., 2006. Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gen Cloning. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN 017-3458 Vol. 9, No. 1, Issue of January 5

Vitisant, T., Leelaruji, W., Chulalaksananukul, S., Wattayakorn, G., dan Chulalaksananukul W, 2013. A High-Activity Lipolytic Yeast Isolated From Sichang Island, Thailand. **Maejo Int J. Sci. Technol**, 7 (Special Issue), 96-105

Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Liu, Z., dan Li, J. 2007. Diversity of Lipase Producing Yeasts from Marine Environmets and Oil Hydrolisis by Their Crude Enzymes. **Annals of Microbiology** 57(4): 495-501

Zaky, A.S., Tucker, G.A., Daw, Z.Y., Du, C., 2014. Marine Yeast Isolation and Industrial Application. **FEMS Yeast Res** 14: 813-825

## BIODATA PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Rurin Luswidya Artaty Umar. Penulis yang akrab di panggil Rurin ini lahir di Kediri, 16 Juni 1994. Penulis menempuh pendidikan formal di SDN 1 Lateng, Banyuwangi, SMPN 1 Banyuwangi, SMAN 1 Glagah, dan melanjutkan ke jenjang sarjana di Biologi ITS Surabaya jalur SNMPTN Tulis. Selama menempuh pendidikan di Biologi ITS pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Mikrobiologi dan sebagai salah satu surveyor Laboratorium Ekologi Biologi ITS. Diluar akademik penulis juga aktif dengan beberapa organisasi dalam ITS maupun luar ITS antara lain untuk didalam jurusan penulis pernah menjadi Sekertaris Media dan Hubungan Luar HIMABITS tahun 2013/2014 dan Ketua Departemen Media dan Hubungan Luar HIMABITS 2014/2015, sedangkan di luar jurusan penulis pernah menjabat sebagai staff Dalam Negeri BEM ITS 2013/2014, Hakim 2 Mahkamah Mahasiswa 2016, dan menjadi BPP (Badan Pengurus Pusat) Ikatan Himpunan Mahasiswa Biologi Indonesia (IKAHIMBI) . Selain organisasi penulis juga pernah mengikuti beberapa pelatihan manajerial antara lain LKKM Pra-TD HIMABITS, LKMM TD HIMABITS, dan PP LKMM FMIPA ITS. Prestasi penulis juga sempat menjadi finalis lomba enterpreneur nasional di Universitas Airlangga. Penulis juga sempat kerja praktek di HSSE PT. Pertamina EP Cepu. Di Jurusan Biologi penulis mengambil bidang minat Mikrobiologi dan hal itu dijadikan dasar untuk pemilihan tugas akhir bertemakan mikroorganisme, terutama *yeast*

Email : [rurin.luswidya.artaty@gmail.com](mailto:rurin.luswidya.artaty@gmail.com)